



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 14 404 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶
A 61 K 35/78

⑳ Aktenzeichen: 198 14 404.0
㉔ Anmeldetag: 31. 3. 98
㉕ Offenlegungstag: 7. 10. 99

DE 198 14 404 A 1

㉑ Anmelder:
Pandalis, Georgios, Dr., 49219 Glandorf, DE

㉒ Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,
Anwaltssozietät, 80538 München

㉓ Erfinder:
Pandalis, Georgios, Dr., 49219 Glandorf, DE;
Wenzel, Uwe, Dr., 35392 Gießen, DE

㉔ Entgegenhaltungen:
Chemical Patents Index, Documentation
Abstracts Journal Sect. B, Derwent Publications,
London 1992, Nr. 92-044315/06 zu JP 03-2 87 526 A;
Jonathan L. Hartwell: Plants Used Against Cancer,
Quarterman Publications, Inc., Lawrence,
Massachusetts 1982, S. 106-107, 129-132, 504-505,
607;
Karl E. Schulte, Gerhard Wulforth, Polyacetylene
aus Aegopodium podagraria L.; Arch. Pharm. 310,
(1977), 285-298;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ㉕ Verwendung von Giersch (*Aegopodium podagraria* L.) zur Behandlung und/oder Prophylaxe von bösartigen Tumoren
- ㉖ Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Giersch (*Aegopodium podagraria* L.) sowie eine Kombination von Giersch mit Alant (*Inula helenium* L.) und/oder Cystus (*Cistus incanus* L.) zur Behandlung und/oder Prophylaxe von bösartigen Tumoren.
Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein pflanzliches Produkt für die Behandlung verschiedener Krebsarten zur Verfügung zu stellen, das keine der Nebenwirkungen zeigt, welche bei herkömmlichen Krebstherapien unumgänglich sind.
Indem die vorliegende Erfindung Pflanzen bzw. Extrakte solcher Pflanzen zur Verfügung stellt, die hemmenden Einfluß auf Zellproliferation und Zelldifferenzierung haben, werden Produkte zur Verfügung gestellt, die wirksam zur Prophylaxe und Therapie von bösartigen Tumoren eingesetzt werden können.

DE 198 14 404 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Giersch (*Aegopodium podagraria* L.) zur Behandlung und/oder Prophylaxe von bösartigen Tumoren. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Giersch in Kombination mit Alant (*Inula helenium* L.) und/oder Cystus (*Cistus incanus* L.) ebenfalls zur Behandlung und/oder Prophylaxe von bösartigen Tumoren.

Nach Herz-Kreislaufkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt. So starben 1996 allein in den Vereinigten Staaten annähernd 550.000 Menschen an Krebs, wobei zu erwarten ist, daß diese Zahl in den nächsten Jahren noch steigen wird.

Grundsätzlich werden diverse Umweltfaktoren, z. B. Rauchen, einseitige Ernährung, Streß, aber auch erbliche Prädisposition, die z. B. bei Brustkrebs nachgewiesen wurde, für die Entstehung von Tumoren verantwortlich gemacht. Diese sind das Resultat meist nur einer veränderten Zelle, in deren Nachkommenschaft sich sukzessive Mutationen anhäufen, so daß Zellhaufen aus morphologisch stark veränderten Zellen entstehen. Diese Zellen zeichnen sich dadurch aus, daß sie eine erhöhte Zellproduktion auf Grund von wachstumsauslösenden Mutationen (Hyperaktivierung von Protoonkogenen) oder von Unterdrückung zelleigener, teilungsinhibierender Prozesse (Inaktivierung von Tumorsuppressoren) aufweisen.

Die Vielzahl der Ursachen für gesteigerte Zellwachstumsraten auf molekularer Ebene spiegelt sich in der großen Zahl unterschiedlicher Tumorformen wieder. Davon kann jedes Gewebe des menschlichen Körpers betroffen sein, wobei je nach Gewebetyp verschiedene Tumorarten unterschieden werden, beispielsweise Sarkome (Bindegewebe), Gliome (Neuronalgewebe) und die weitaus am häufigsten auftretenden Carzinome (Epithelialgewebe).

Die wohl am häufigsten angewandte Therapie gegen malignes Zellwachstum ist das operative Entfernen des krankhaften Gewebes. Dabei muß jedoch auch oft gesundes Gewebe entfernt werden und selbst dann kann nicht ausgeschlossen werden, daß einige entartete Zellen verbleiben und erneut einen Tumor bilden. Weitere Möglichkeiten bestehen darin, durch Bestrahlung (Radio- und Ionentherapie) die entarteten Zellen abzutöten. Da diese Methoden jedoch nicht sehr spezifisch sind, wird auch hier gesundes Gewebe beschädigt. Eine relativ effektive Therapie stellt die kombinierte Verabreichung mehrerer Chemikalien dar, die die Zellteilung unterschiedlicher Zellarten hemmen (Chemo-therapie). Auch hierbei werden auf Grund der geringen Spezifität viele gesunde Zellen abgetötet, und die Patienten leiden an Nebenwirkungen, wie starker Übelkeit und Erbrechen, Haarausfall und allgemeinem Schwächegefühl.

Auch "weiche" Methoden, wie die Stärkung des körpereigenen Immunsystems durch Interferone oder der Einsatz monoklonaler Antikörper, die sich spezifisch gegen entartete Zellen richten sollen, haben nachteilige Wirkung auf den Patienten.

Pflanzliche Alkaloide, die die Bildung der zur Zellteilung benötigten Mikrotubuli inhibieren, werden ebenfalls zur Krebstherapie eingesetzt. Beispiele für solche Substanzen sind Vinblastin, Vinorelbine, Paclitaxel und Docetaxel. Auch hier besteht das Problem, daß diese Substanzen unspezifisch sind und damit auch auf gesundes Gewebe schädigend wirken.

Auf Grund der hohen Mortalitätsraten durch Krebs und des oft für den Erkrankten qualvollen Krankheitsverlaufs besteht ein großer Bedarf an gut verträglichen Mitteln zur Prophylaxe und zur Therapie von Krebs, die es erlauben, malignes Zellwachstum zu inhibieren, ohne jedoch gesunde Zellen zu schädigen.

Die Gattung *Aegopodium podagraria* L. umfaßt etwa sieben Arten, die in Europa und Asien verbreitet sind und im deutschsprachigen Raum als Giersch, Zipperleinskraut, Dreiblatt oder Geißfuß bekannt sind. Die krautige Pflanze wird bis heute als Speisepflanze verwendet, wobei vor allem die Blätter und Blattstiele roh (als Salat) oder gekocht (als Gemüse) verzehrt werden. Giersch ist eine seit langem bekannte Heilpflanze, die traditionell zur Behandlung von Rheuma, Gicht und Hämorrhoiden in Form von Teeaufgüssen, innerlich und äußerlich, Umschlägen und Heilbädern angewandt wird. Klinische Studien oder dokumentierte Erfahrungsberichte zur Wirksamkeit bei den genannten Anwendungsgebieten liegen nicht vor, so daß die Wirksamkeit der Droge und ihrer Zubereitungen nicht belegt ist.

In Giersch konnten hohe Konzentrationen an Vitaminen, wie Vitamin C (200 mg/100 g Blätter) und Karotin (5 mg/100 g Blätter), sowie Mineralien, wie Eisen (17 mg/100g), Kupfer (2 mg/100g), Mangan (2,2 mg/100g), Titan (1,77 mg/100g) und Bor (4 mg/100g), nachgewiesen werden. Dabei variiert der Vitamin C-Gehalt der Blätter in Abhängigkeit von der Jahreszeit; im Frühjahr ist der Gehalt am höchsten und nimmt bis zum Spätsommer um ca. 50% ab.

Weitere Inhaltsstoffe von Giersch sind ätherische Öle, die in allen Pflanzenteilen enthalten sind und deren Zusammensetzung bisher noch nicht bekannt ist. Bisher nachgewiesene Stoffe sind Falcariindiol, Apterine (Furanocumarin-Glycoside), wie Hyperosid, Isoquercitin, Kämpferolrhamnoglucosid, ein hochmolekulares Lectin (ca. 480.000 Da) aus dem Rhizom, welches vorzugsweise nicht Erythrozyten der Blutgruppe A agglutiniert, Phenolcarbonsäuren, wie Kaffeesäure und Chlorogensäure, sowie β -Sitosterin, Umbelliferose und Cumarine (Hagers Handbuch der pharmazeut. Praxis, 1992, Springer Verlag).

Die Gattung *Inula helenium* L. umfaßt ca. 120 Arten, wovon etwa 25 Arten in Europa heimisch sind. Bekanntere Trivialnamen dieser Pflanze sind u. a. echter Alant, Schlangenzunge oder Helenenkraut. In seiner volkstümlichen Anwendung wird Alant innerlich gegen Verdauungsstörungen, Menstruationsbeschwerden, Infektionen der ableitenden Harnwege, bei Erkrankungen der Atemwege, wie Bronchialkatarrh, Keuchhusten und Reizhusten, sowie bei Bronchitis als Expectorans, bei Herzbeschwerden, Erkältung, Kopfschmerzen und Wurmbefall eingesetzt und äußerlich bei Exanthenen und Infektionen der Haut angewendet. Dabei können als unerwünschte Nebenwirkungen Kontaktallergien und -dermatitis ausgelöst werden.

Eine antimikrobielle Wirkung, die sich vor allem gegen gram-negative Bakterien richtet, beruht in erster Linie auf dem Gehalt von Sesquiterpenlactonen in Alant. Der Petrolether der Droge (Helenin) hat in vitro eine minimale Hemmkonzentration von 10–400 μ g/ml bei gram-negativen und 100–800 μ g/ml bei gram-positiven Bakterien. Bei *Fusarium solani* liegt eine fungistatische Aktivität von Alantolacton bei 100–200 μ g/ml in vitro vor. Desweiteren konnte ebenfalls eine anti-anthemintische Aktivität des wäßrigen Drogenextraktes in vivo und eine blutgerinnungsfördernde Wirkung durch Helenin (2–10 mg/kg Körpergewicht) in vivo nachgewiesen werden.

Ebenfalls belegt ist eine anti-tumorale Wirkung von Alantolacton und Isoalantolacton aus Alant, welche ab einer Kon-

zentration von 50 µg/ml zu 100% das Wachstum einer menschlichen Lungencarcinomzelllinie hemmen. Ein nicht näher spezifiziertes Extrakt hat i.p. (20-160 mg/kg Körpergewicht, verschiedene Applikationsintervalle) an verschiedenen transplantierten Sarcomen der Ratte eine hemmende Wirkung auf das Tumorstadium bei geringer Toxizität.

Die Inhaltsstoffe von Alant, besonders die der Wurzel, sind relativ gut charakterisiert. So wurde in den Blüten Quercetin, Quercitrin-7-triglucoosid und Methylquercetin, in den Blättern I-Inositol und der Bitterstoff Alantopikrin und in den anderen oberirdischen Pflanzenteilen Sesquiterpenlactone sowie Petaine nachgewiesen. Die Wurzel enthält ätherische Öle, Terpene, Wachse und Polysaccharide. In Abhängigkeit von der Vegetationsperiode kann der Anteil an ätherischen Ölen bis zu 5% betragen, wobei der höchste Gehalt im Herbst gemessen wird. Davon besteht der größte Teil aus Sesquiterpenlactonen des Eudesmanolidtypus: bis zu 2% Alantolacton, bis zu 2,7% Isoalantolacton, daneben geringe Mengen Dihydroisoalantolacton, Dihydroalantolacton und Tetrahydroalantolacton. Das Gemisch dieser Alantolactonderivate wird u. a. auch als Helenin oder Alantcampher bezeichnet. Desweiteren wurden u. a. Spuren von Petainen und Harze und Wachse gefunden. Von dem Polysaccharid Inulin, das bis zu 44% ausmacht, leitet sich der Name der Pflanzengattung ab. Weiter sind Pectine und Polyfructosane, die abhängig von der Jahreszeit als enzymatische Abbauprodukte des genuinen Reservopolymers auftreten, nachgewiesen worden. Als Zubereitungsform ist der alkoholisch-wässrige Extrakt der Wurzel bekannt (Hagers Handbuch der pharmazeut. Praxis, 1992, Springer Verlag).

Die Gattung *Cistus incanus* L. ist vor allem im Mittelmeerraum verbreitet. Die recht seltene Pflanze wächst als aromatisch riechender Strauch mit eiförmig-lanzettlichen Blättern und rosaroten Blüten auf magnesiumreichen Böden. Die Volksmedizin nutzte die Wirkung dieser Pflanze in unterschiedlichster Weise, hauptsächlich jedoch zum Stillen von Juckreiz (Hämorrhoiden), Allergien und ganz allgemein zur Wundbehandlung, d. h. zur Therapie von lokalen bakteriellen Infektionen und Mykosen. Die Pflanze wird ebenfalls zur Infektionsprophylaxe in Form von Körperwaschungen oder als Breiverband auf offenen Wunden eingesetzt. Die traditionellen Heilverfahren benutzen dafür die gekochten wässrigen Extrakte der oberirdischen Pflanzenteile, welche im Frühjahr gesammelt werden. In jüngster Zeit wurden Cystuslösungen ebenfalls erfolgreich zur Behandlung von Neurodermitis, Akne vulgaris, Entzündungen des Mund- und Rachenraumes, sowie zur Karies- und Parodontoseprophylaxe eingesetzt.

Phytochemische Untersuchungen der Gattung *Cistus* L. konzentrierten sich auf die Analyse der ätherischen Öle und Harzbestandteile (Terpenoide) sowie der Flavonoide und Gerbstoffe. Als Bestandteile des ätherischen Öls von *Cistus incanus* L. sind Monoterpene, Sesqui- und Diterpene sowie Ester und Alkohole identifiziert worden. Die Diterpene machen dabei mit einem ungewöhnlich hohen Anteil von knapp 60% die Hauptmenge des ätherischen Öls aus. Als polyphenolische Inhaltsstoffe von Cystus wurden Kämpferol, Quercetin sowie für *Cistus incanus* Methyl ether von Apiginin nachgewiesen (Beate-Smith (1962), Dicotyledones; J. Linn. Soc. London (Botany), 58, S. 95; Lebreton und Bonchez (1967), Phytochemistry, 6, S. 1601; Vogt et al. (1987), Phytochemistry, 26, S. 1027; Wollenweber und Mann (1984), Naturforsch. 39c, S. 303).

Die historisch ältesten Überlieferungen zu *Cistus* L. betreffen das Labdanum-Harz, welches hauptsächlich aus den Blättern und Zweigen von *Cistus ladaniferus* L., *Cistus monspeliensis* L. und *Cistus incanus* L. ssp. *creticus* gewonnen wurde. Dieses seit dem Altertum bekannte Harz diente vor allem wegen seines Wohlgeruchs zu Räucherzwecken, aber auch medizinisch als Expectorans bei Katarrhen, äußerlich in Pflasterform zur Behandlung von Geschwüren und als Zusatz in Wundsalben. Eine Verwendung außerhalb des Mittelmeerraumes als Abführmittel (Depurativum) bei der Behandlung lepröser Erkrankungen wurde ebenfalls berichtet. Als mögliche Nebenwirkungen eines wiederholten Kontaktes mit Blättern von *Cistus incanus* kann in seltenen Fällen eine allergische Dermatitis auftreten.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein pflanzliches Produkt zur Behandlung und/oder Prophylaxe von bösartigen Tumoren bereitzustellen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung von Giersch (*Aegopodium podagraria*) zur Behandlung und/oder Prophylaxe von bösartigen Tumoren.

Erfindungsgemäß konnte überraschend eine neue, zellwachstumshemmende und zeldifferenzierungsfördernde Wirkung von Giersch wissenschaftlich nachgewiesen werden.

In einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform wird Giersch in Kombination mit Alant verwendet.

In einer weiteren bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform wird Giersch in Kombination mit Cystus und gegebenenfalls Alant eingesetzt.

Erfindungsgemäß können die ganzen Pflanzen von Giersch, Alant und Cystus und/oder Pflanzenteile davon, wie Wurzeln, Blätter, Blüten und/oder Samen, verwendet werden. Von Giersch und Cystus werden bevorzugt oberirdische Pflanzenteile verwendet, während von Alant vorzugsweise unterirdische Pflanzenteile verwendet werden.

Giersch, Alant und auch Cystus werden bereits seit Jahrhunderten von Menschen verzehrt, ohne daß schädliche Wirkungen, ausgenommen Kontaktallergien durch Alant bzw. Cystus, bekannt sind. Durch die Anwendung der oben genannten Pflanzen und/oder Pflanzenteile zur Therapie von Krebs werden die oft gravierenden Nachteile der herkömmlichen Krebstherapien umgangen.

Giersch sowie Alant und Cystus können erfindungsgemäß in pharmazeutisch geeigneter Darreichungsform verwendet werden. Sie können beispielsweise in Form zerkleinerter Pflanzenteile vorliegen, die aus getrockneten oder frischen Pflanzen bzw. Pflanzenteilen von Giersch und gegebenenfalls Alant und/oder Cystus hergestellt wurde. Weitere Beispiele für pharmazeutisch geeignete Darreichungsformen sind wässrige, alkoholische und/oder ölige Extrakte, Konzentrate, Granulate, Tabletten, Kapseln und Salben.

Außerdem können erfindungsgemäß weitere Wirkstoffe, wie Vitamine, Mineralien und sekundäre Pflanzenstoffe, verwendet werden. Beispiele für Mineralien sind Calcium, Magnesium und Selen. Beispiele für Vitamine sind die Vitamine A, C, E sowie die Vitamine des B-Komplexes. Die Mineralien und/oder Vitamine können als solche oder in Form von Zubereitungen zugegeben werden. Dabei sind pflanzliche Quellen bevorzugt. Sekundäre Pflanzenstoffe sind z. B. Fette und Öle, Pigmente, Farbstoffe und Harze.

Weiter können pharmazeutisch unbedenkliche bzw. annehmbare natürliche oder synthetische Zusätze oder Hilfsstoffe, wie Bindemittel, Sprengmittel, Gleitmittel, Trennmittel, Lösungsmittel, Stabilisatoren, Färbemittel und Geschmackskorrigentien, zugegeben werden, die in Abhängigkeit von der gewünschten Darreichungsform ausgewählt werden. Bei-

spiele für erfindungsgemäß verwendbare Hilfsstoffe sind

- Bindemittel, wie Stärke, Alginate, Gelatine, Zucker, Johannisbrotkernmehl, Cellulosederivate, wie Celluloseether, und Polymere, wie Polyvinylpyrrolidon;
- Sprengmittel, wie Stärke und Stärkeether;
- Gleit- und Trennmittel, wie Talkum, Stearate, wie Calcium- und Magnesiumstearat, Magnesium- und Calciumcarbonat, Cellulose, Magnesiumoxid, kolloidale Kieselsäure, Silikate, wie Natrium-, Magnesium-, Calcium- und Aluminiumsilikat, Trennmehle, wie Brotmehl, Getreideschalen-, Kartoffelwalz-, Buchweizen- und Holzmehl und Johannisbrotkernmehl;
- Lösungsmittel, wie Wasser, Alkohol und Lösungen von Bindemitteln;
- Stabilisatoren, wie Fette, Öle, Aromastoffe und Stärkederivate;
- Färbemittel, wie lebensmittel-, und arzneimittelrechtlich zulässige natürliche und synthetische Farbstoffe und Pigmente, beispielsweise Caroten, Zuckercouleur, Betanin und Iycopin; und
- Geschmackskorrigentien, wie Gewürze, Kräuter, Salze, Süßungsmittel und Aromastoffe.

Die genannten Hilfsstoffe eignen sich insbesondere zum Tablettieren und Granulieren.

- Die in den erfindungsgemäß verwendeten Pflanzen oder Pflanzenteilen enthaltenen flüssigen und/oder flüchtigen Bestandteile, insbesondere Wasser, können daraus durch übliche Maßnahmen, beispielsweise durch Trocknen mit Luft, insbesondere mit vorgetrockneter Luft, Trocknen durch überkritisches CO₂, Gefriertrocknen, Sprühtrocknen oder Einengen im Vakuum, abgetrennt werden. Das Konzentrationsverhältnis liegt vorzugsweise im Bereich von 10 : 1 bis 10 : 2, insbesondere im Bereich von 10 : 1,5.

- Das Konzentrat kann dann, ebenso wie die getrockneten Pflanzen und/oder Pflanzenteile, in üblicher Weise zu Tabletten, Granulaten, Pulvern, Pellets oder Kapseln verarbeitet werden. Vorzugsweise wird das Konzentrat erfindungsgemäß in Form von Granulaten verwendet, die durch übliche Granulierungsverfahren, wie Feucht-, Trocken- oder Schmelzgranulieren, hergestellt werden können.

- Beispielsweise können die Granulate durch aufbauende oder abbauende Feuchtgranulierungsverfahren hergestellt werden, die beispielsweise in Ullmann, Encyclopädie der Technischen Chemie, Bd. 18, S. 157, 4. Auflage 1979, beschrieben sind. Als Hilfsstoffe können die oben genannten Bindemittel, Trennmittel und Lösungsmittel, hier eingesetzt als Granulierflüssigkeit, verwendet werden.

- Das nach diesen oder anderen Verfahren hergestellte Granulat kann als solches verwendet werden. Alternativ kann es, gegebenenfalls in Kombination z. B. mit Granulaten und/oder Pulvern, die weitere Mineralstoffe und/oder Vitamine enthalten, zu Tabletten, Dragees oder Kapseln, wie Gelatine-, Pektin-, Cellulose-, Naturharz- oder Stärkekapseln, weiterverarbeitet werden.

- Fig. 1** zeigt die Proliferation von HT-29 Zellen als Funktion der Konzentration eines erfindungsgemäß verwendeten DMSO-Extraktes aus Giersch.

- Fig. 2** zeigt die Proliferation von MCF7-Zellen als Funktion der Konzentration eines erfindungsgemäß verwendeten PBS-Extraktes aus Alant (Extrakt 3) und Cystus (Extrakt 4)

- Fig. 3** zeigt die Proliferation von MCF7-Zellen als Funktion der Konzentration eines erfindungsgemäß verwendeten DMSO-Extraktes aus Alant (Extrakt 3) und Cystus (Extrakt 4)

- Das nachfolgende Beispiel erläutert die Erfindung:

Beispiel

Herstellung eines Pflanzenextraktes

- 500 mg Pflanzenmaterial (Giersch, Alant) wurden mit 5 ml DMSO oder alternativ mit 5 ml PBS-Puffer versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur geschüttelt. Danach wurden die Proben für 2 Min bei 6000 UpM in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der entnommene Überstand wurde nochmals für 2 Min bei 10.000 UpM zentrifugiert. PBS-Extrakte wurden sterilfiltriert, bevor sie dem Zellkulturmedium zugegeben wurden. Der erhaltene Überstand wurde zur Behandlung von Zellen in vitro eingesetzt.

- Mit DMSO oder PBS-Puffer versetztes Pflanzenmaterial von Cystus wurde 4 h bei 80°C geschüttelt. Anschließend wurden die Mischungen bei 10.000 g für 10 Min zentrifugiert. PBS-Extrakte wurden vor Zugabe zum Zellkulturmedium sterilfiltriert.

- Extrakt 1: Giersch (ganze Pflanzen)
 Extrakt 2: "x" Teile Giersch und "y" Teile Alant; "x" und "y" sind für jedes Experiment gesondert angegeben
 Extrakt 3: Alant (ganze Pflanzen)
 Extrakt 4: Cystus (oberirdische Pflanzenteile)

Zellkultur zweier humaner Darmcarcinomzelllinien

- Caco-2 Zellen (Braunschweig, Passage 40) wurden in DMEM-Medium (Gibco) kultiviert. Die Passagen fanden stets prekonfluent (etwa 80%ige Konfluenz) statt. Die Medien wurden mit 10% fötalem Kälberserum (FKS), 2 mM Glutamin, 1% MEM nichtessentiellen Aminosäuren und 70 µg/ml Gentamicin supplementiert. Die Inkubation der Zellen fand bei 37°C unter CO₂-Begasung (5% CO₂) statt.

- HT-29 Zellen (Passage 141) wurden in RPMI-1640 Medium (Gibco) kultiviert, das durch 10% FKS, 2 mM Glutamin, 100 I.U./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiert war.

- MCF7-Zellen (zur Verfügung gestellt von Dr. Ulf Vogt) wurden in "minimal essential medium" (MEM) nach Eagle H., Science 130, S. 432-437 (1959) kultiviert. 2 ml Volumen einer einheitlichen Zellsuspension mit ca. 100.000 Zellen

/ml wurden für 6 Tage unter Standardbedingungen auf Kulturschalen mit 35 mm Durchmesser kultiviert. Jeder Schale wurden 20 µl der verdünnten und vorbehandelten Extrakte zugesetzt.

Proliferationstests

Die Proliferation der HT-29 bzw. Caco-2 Zellen wurde mit Hilfe eines DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes (Sytox-Green, Molecular Probes; Leiden, Niederlande) bestimmt, der nur Zellen mit defekter Zellmembran zu permeieren vermag. Nach Erstellen einer Eichkurve konnte anhand der gemessenen Fluoreszenz zunächst die Anzahl der toten Zellen und anschließend, nach Lyse der Zellen mit dem Detergens Triton-X 100 (1% Endkonzentration), die Gesamtzahl als Parameter der Proliferation bestimmt werden. Die Cytotoxizität einer Substanz ergab sich aus dem Anteil der toten Zellen an der Gesamtzahl. Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem Mikrotiterplattenreader (Fluoreskan Ascent, Lab-systems, Merlin Diagnostika, Bornheim-Hersel, Deutschland) durchgeführt. Für die Proliferationsmessungen wurden jeweils 2.000 HT-29 bzw. 5.000 Caco-2 Zellen auf 24 'well'-Plastik-Zellkulturplatten der Firma Renner ausgesät. Man ließ die Zellen für 24 h auf den Platten anwachsen, bevor die sterilfiltrierten Extrakte im Kulturmedium auf die Zellen gegeben wurden. Nach 72 h wurden die entsprechenden Parameter gemessen (n=4). Die Kontrolle enthielt die im jeweiligen Versuch maximal eingesetzte DMSO-Konzentration, um etwaige DMSO-Effekte der entsprechenden Extrakte auf das Wachstum der Zellen auszuschließen.

Differenzierungstest

Effekte auf die Differenzierung der Zellen wurden anhand der Aktivitätsmessung der alkalischen Phosphatase bestimmt, die ein Markerenzym der Bürstensaummembran darstellt. Dazu wird die Freisetzung von Fluorescein aus Fluoresceindiphosphat (Molecular Probes) als Funktion der Zeit fluoreszenzoptisch ermittelt. Die Zellen wurden mit 50%iger Konfluenz in 25 cm² Flaschen ausgesät und in Anwesenheit des Extraktes für 3 Tage inkubiert. Nach Trypsinisieren der Zellen wurden diese abzentrifugiert, auf 24 'well'-Platten überführt und die Messungen durchgeführt. Ein Aliquot der trypsinisierten Zellen diente der Zellzahlbestimmung.

Zellproliferation in Gegenwart von DMSO-Extrakten von Giersch

In Tabelle 1(A) bis (D) ist der Effekt verschiedener Konzentrationen eines Giersch-Extraktes dargestellt. Dazu wurden Caco-2 und HT-29 Zellen in 10% FKS-haltigem Medium ausgesät und nach 24 h mit 2%, 1% und 0.5% (A,B,C) eines wie oben beschrieben isolierten Extraktes aus Giersch (Extrakt 1) behandelt. Die Zellzahlen wurden nach 72 h bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als % der ausschließlich mit DMSO-behandelten Zellen (Kontrolle=100%). Die Zahl der toten Zellen wurde mit Hilfe des Farbstoffs Sytox-Green bestimmt und als % der lebenden Zellen der Kontrolle dargestellt. Die Proliferation von HT-29 und Caco-2 Zellen in Gegenwart von Extrakten aus Giersch in Anwesenheit geringer FKS-Konzentrationen (0,1%) ist in (D) dargestellt.

Tabelle 1

(A) Zellproliferation von Caco-2 und HT-29 Zellen in Gegenwart eines DMSO-Extraktes (2%) aus Giersch

	Gesamtzellzahl (%)		Anzahl toter Zellen (%)	
	Kontrolle	Extrakt 1	Kontrolle	Extrakt 1
Caco-2	100±5,3	5,5±1,0	1,6±0,3	0,2±0,1
HT-29	100±4,0	5,1±2,3	4,7±2,0	0,5±0,2

(B) Zellproliferation von Caco-2 und HT-29 Zellen in Gegenwart eines DMSO-Extraktes (1%) aus Giersch

	Gesamtzellzahl (%)		Anzahl toter Zellen (%)	
	Kontrolle	Extrakt 1	Kontrolle	Extrakt 1
Caco-2	100±2,2	8,0±1,2	3,2±1,5	0,2±0,1
HT-29	100±6,1	4,1±1,0	3,0±1,1	1,0±0,5

(C) Zellproliferation von Caco-2 und HT-29 Zellen in Gegenwart eines DMSO-Extraktes (0,5%) aus Giersch

Gesamtzellzahl (%) Anzahl toter Zellen (%)

	Kontrolle	Extrakt 1	Kontrolle	Extrakt 1
Caco-2	100 \pm 7,0	14,0 \pm 3,3	2,2 \pm 1,5	3,1 \pm 2,0
HT-29	100 \pm 9,7	29,5 \pm 4,9	4,8 \pm 3,8	2,6 \pm 0,5

(D) Zellproliferation von Caco-2 und HT-29 Zellen in Gegenwart eines DMSO-Extraktes (0,1%) aus Giersch bei niedriger FKS-Konzentration (0,1%)

	Zellzahl (%)
HT-29 ohne Extrakt	100 \pm 4,9%
HT-29 mit Extrakt 1	15,1 \pm 1,3
Caco-2 ohne Extrakt	100 \pm 5,4%
Caco-2 mit Extrakt 1	10,5 \pm 6,3%

Zellproliferation in Gegenwart kombinierter Extrakte aus Giersch und Alant

In Tabelle 2 ist die Wirkung der Kombination von Giersch- und Alant-Extrakten auf die Zellproliferation dargestellt. Dazu wurden HT-29 Zellen, wie oben beschrieben, ausgesät und mit dem Extrakt von Giersch (Extrakt 1) und Alant (Extrakt 3) alleine oder in Kombination (Extrakt 2) inkubiert und die Zellzahl, dargestellt als % der ausschließlich mit DMSO behandelten Kontrolle, nach 72 h bestimmt.

Tabelle 2

Wirkung der Kombination eines Giersch-Extraktes auf die Proliferation von HT-29 Zellen

(A)

Extrakt (Konz. in %)	Zellzahl (% der Kontrolle)
Kontrolle	100 \pm 4,1
Extrakt 1 (0,5%)	40,4 \pm 2,0
Extrakt 2 (0,5% Giersch+0,005 % Alant)	42,5 \pm 7,4
Extrakt 3 (0,005%)	70,2 \pm 6,0

(B)

Extrakt (Konz. in %)	Zellzahl (% der Kontrolle)
Kontrolle	100 \pm 3,3
Extrakt 1 (0,1%)	71,6 \pm 3,7
Extrakt 2 (0,1% Giersch+0,0025% Alant)	75,4 \pm 2,7
Extrakt 3 (0,0025%)	73,0 \pm 7,4

Zelldifferenzierung in Gegenwart von DMSO-Extrakten aus Giersch

In Tabelle 3 ist die differenzierungsfördernde Wirkung von einem Extrakt aus Giersch (Extrakt 1) beschrieben. Mit Hilfe des oben beschriebenen Differenzierungstests wurde die Aktivität von alkalischer Phosphatase in zwei verschiedenen Zelllinien untersucht. Besonders Caco-2 Zellen zeigen eine stark erhöhte Anzahl differenzierter Zellen, während HT-29 Zellen durch Giersch-Extrakt nur in geringem Maß zur Differenzierung angeregt werden.
n.b. = nicht bestimmt

Tabelle 3

Differenzierung von HT-29 und Caco-2 Zellen nach Inkubation mit einem DMSO Extrakt aus Giersch

Alkalische Phosphatase Aktivität/ 1×10^6 Zellen
(% der Kontrolle)

Konzentration des Extraktes [%]	HT-29	Caco-2
0,25	90 \pm 10	n.b.
0,5	100 \pm 5	130 \pm 13
1	106 \pm 10	298 \pm 30

Cytotoxizität von DMSO-Extrakten aus Giersch

In Tabelle 4 ist die differenzierungsfördernde Wirkung von Giersch-Extrakten aus HT-29 dargestellt. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben ausgesät und das Medium mit verschiedenen Konzentrationen des DMSO-Extraktes 1 (Giersch; 0,5% bis 5%) versetzt. Nach 3 h bzw. 24 h wurde, wie oben beschrieben, die Gesamtzellzahl und Anzahl der toten Zellen bestimmt und in %, bezogen auf die Anzahl der ausschließlich mit DMSO behandelten Zellen, dargestellt. Für die mit Giersch-Extrakt behandelten Zellen betrug die Zellzahl der Kontrollen 51.210 HT-29 Zellen (3h Kontrolle) und 79.210 HT-29 Zellen (24h Kontrolle).
n.b. = nicht bestimmt

Tabelle 4

Akute Cytotoxizität und 24 h-Cytotoxizität in HT-29 Zellen durch DMSO-Extrakt aus Giersch

	3 h	24 h
Konz. des Extraktes 1 (%)	Gesamtzellzahl (Anzahl toter Zellen) in [%] der unbehandelten Kontrolle = 100%	Gesamtzellzahl (Anzahl toter Zellen) in [%] der unbehandelten Kontrolle = 100%
0,5	107,5 \pm 2,5 (4,5 \pm 0,6)	101,0 \pm 5,1 (1,7 \pm 0,2)
1	104,7 \pm 3,8 (5,0 \pm 1)	75,5 \pm 4,0 (2,7 \pm 0,5)
2	92,5 \pm 5,3 (4,2 \pm 3)	68,8 \pm 4,1 (3,0 \pm 0,1)
5	81,3 \pm 2,5 (7,5 \pm 4,5)	n.b. n.b.

Proliferationshemmende Wirkung von Alant und Cystus

Das relative Wachstum von MCF7-Zellen in Gegenwart von DMSO- und PBS-Extrakten von Alant und Cystus wird in Tabelle 5 gezeigt. Die Alant- und Cystus-Extrakte wurden in einer Verdünnung von 1 : 1.000 eingesetzt. Aus der Tabelle kann entnommen werden, daß DMSO-Extrakte aus Alant und Cystus die Proteinsynthese und Lactatdehydrogenase-Werte (LDH) am stärksten reduzieren, während die PBS-Extrakte eine weniger stark inhibierende Wirkung zeigen.

Dabei ist jedoch die Wirkung des Cystus-PBS-Extraktes wesentlich deutlicher ausgeprägt als die Hemmwirkung des Alant-PBS-Extraktes. Die angegebenen Prozentzahlen stellen Mittelwerte aus je drei Experimenten dar.

Tabelle 5

Relatives Wachstum der MCF7-Zellen in Gegenwart von Pflanzenextrakten aus Alant und Cystus

Extrakt aus	relatives Zellwachstum mit			
	DMSO-Extrakt		PBS-Extrakt	
	Protein (%)	LDH (%)	Protein (%)	LDH
Inula helenium	12,3	14,8	60,5	54,2
Cistus incanus	13,3	15,7	20,9	29,7

EC₅₀-Werte der Pflanzenextrakte

Durch Inkubation von MCF7-Zellen mit DMSO- bzw. PBS-Extrakten von Alant und Cystus in ansteigenden Konzentrationen wurde die Hemmwirkung dieser Extrakte auf die Zellproliferation in Abhängigkeit ihrer Konzentration untersucht. Aus den in Fig. 2 und 3 dargestellten Kurvenverläufen läßt sich die halbmaximale Hemmkonzentration (EC₅₀-Wert) bestimmen. In Tabelle 6 sind die für Alant und Cystus berechneten EC₅₀-Werte zusammengefaßt. Die DMSO-Extrakte für Alant und Cystus zeigen halbmaximale Hemmwirkung bereits bei einer geringen Extraktkonzentration, während höhere Konzentrationen der PBS-Extrakte eingesetzt werden müssen, um dieselbe Hemmwirkung zu erreichen. Dabei liegt der EC₅₀-Wert für Cystus jedoch weit unter dem von Alant.

Tabelle 6

Errechnete EC₅₀-Werte für die Pflanzenextrakte von Alant und Cystus

Extrakt aus	EC ₅₀ -DMSO	EC ₅₀ -PBS
Inula helenium	0,017%	0,118%
Cistus incanus	0,019%	0,042%

In Fig. 1, 2 und 3 ist die Proliferation von HT-29-Zellen bzw. MCF7-Zellen als Funktion der DMSO-Extrakte 1, 3 und 4 bzw. des PBS-Extraktes 3 und 4 dargestellt. Dazu wurden HT-29-Zellen und MCF7-Zellen, wie oben beschrieben, ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte behandelt. Aus der graphischen Darstellung der Relation zwischen Zellzahl (% der ausschließlich mit DMSO bzw. PBS behandelten Kontrolle) bei gegebener Extraktkonzentration läßt sich die halbmaximale Hemmwirkung EC₅₀ ermitteln, die für das DMSO-Extrakt 1 in HT-29-Zellen bei 0,45% liegt, während die EC₅₀-Werte für die DMSO-Extrakt 3 und 4 jeweils bei 0,017% und 0,019% bzw. für die PBS-Extrakte 3 und 4 bei jeweils 0,118% und 0,042% liegen.

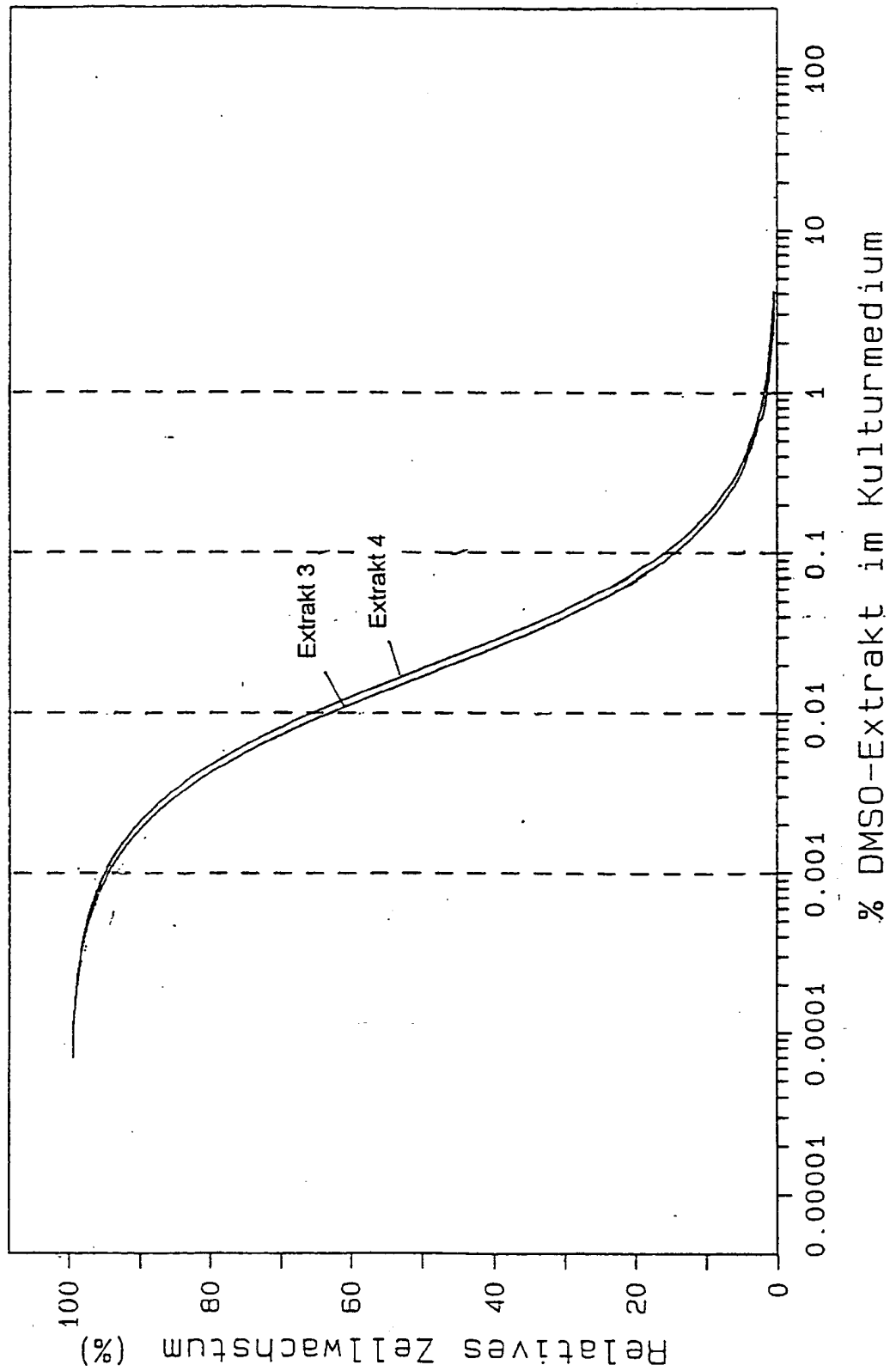
Patentansprüche

1. Verwendung von Giersch (*Aegopodium podagraria* L.) zur Behandlung und/oder Prophylaxe von bösartigen Tumoren.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Giersch (*Aegopodium podagraria* L.) in Kombination mit Alant (*Inula helenium* L.) verwendet wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Giersch in Kombination mit Cystus (*Cistus incanus* L.)
4. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 in oraler Form.
5. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 in Form von Extrakten der lipophilen Komponenten.
6. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß Cystus (*Cistus incanus*) in Form von Extrakten der hydrophilen Komponenten verwendet wird.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

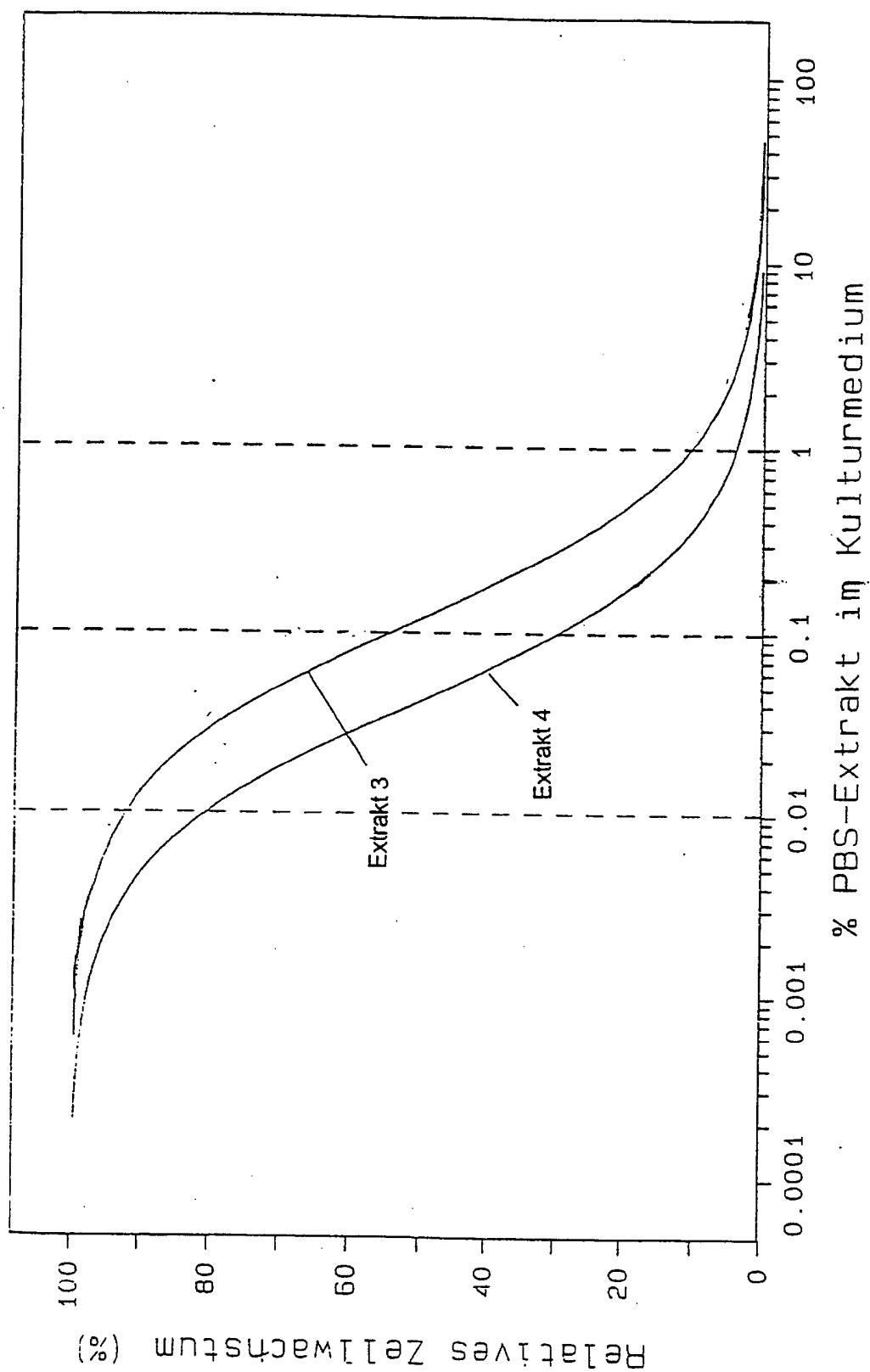
FIGUR 3

Proliferation von MCF7-Zellen als Funktion der Konzentration von DMSO-Extrakten aus Alant und Cystus



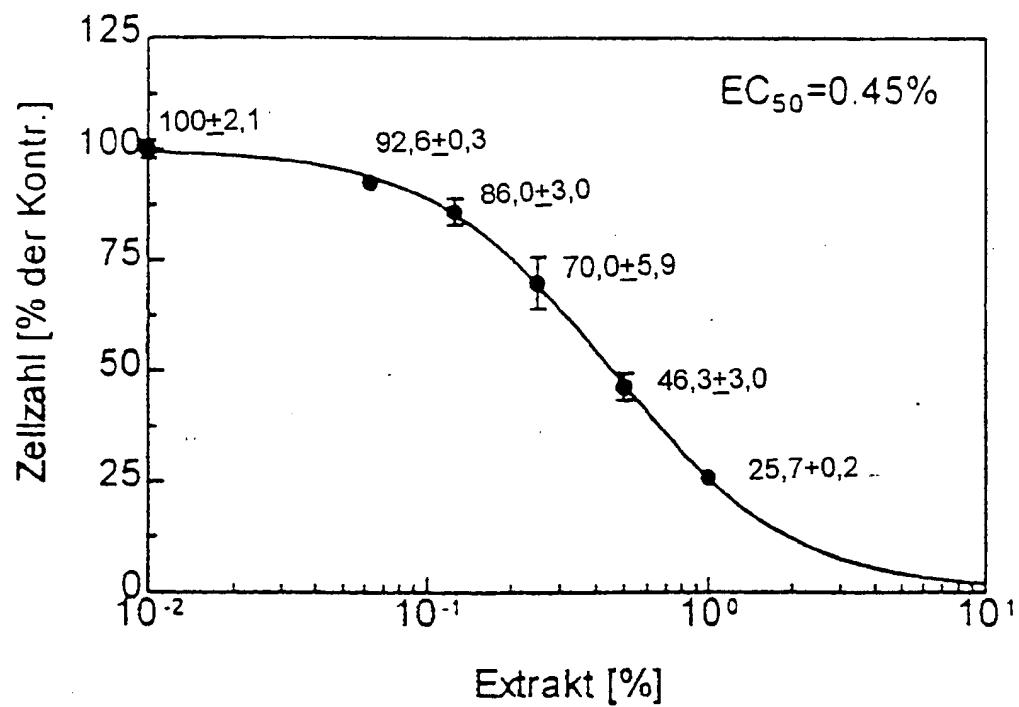
FIGUR 2

Proliferation von MCF7-Zellen als Funktion der Konzentration von PBS-Extrakt aus Alant und Cystus



Figur 1

Proliferation von HT-29 Zellen als Funktion der Konzentration von DMSO-Extrakt aus
Giersch



- Leerseite -

THIS PAGE BLANK (USPTO)